

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.016

· 短篇论著 ·

人宫颈癌中 *EGFR* 基因突变的检测

Detection of *EGFR* gene mutation in human cervical cancer

钟丽¹, 傅芬¹, 蔡勇² (1. 南昌大学医学院第二附属医院妇产科, 江西南昌 330006; 2. 南昌大学研究生院医学部, 江西南昌 330006)

[摘要] 目的: 分析人宫颈癌组织中表皮生长因子受体基因(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)突变的发生和突变类型, 为临床针对 *EGFR* 的靶向治疗宫颈癌提供实验依据。方法: 选取 86 例宫颈癌患者的病理组织石蜡标样, 采用酚氯仿法抽提基因组 DNA, 分别采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术及聚合酶链反应-限制性片段长度多态分析(restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, PCR-RFLP)检测人宫颈癌组织 *EGFR* 基因是否存在第 19 外显子的缺失突变及第 21 外显子的点突变。结果: 在 86 例人宫颈癌组织标本中, PCR 未检测到 *EGFR* 基因第 19 外显子的缺失突变, PCR-RFLP 未检测到 *EGFR* 基因第 21 外显子的点突变。结论: 人宫颈癌组织 *EGFR* 基因中未检测到第 19 外显子缺失突变和第 21 外显子的点突变。

[关键词] 宫颈肿瘤; 表皮生长因子受体; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态; 基因突变

[中图分类号] R737.33; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0665-03

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 全球发病率在女性恶性肿瘤中居第二位。对于晚期宫颈癌, 标准放疗联合以顺铂为基础的化疗只能提高部分患者的生存率。因此, 寻找宫颈癌的最佳治疗方案具有迫切性和必要性。*EGFR* 属 I 型跨膜酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TK) 生长因子受体, 是原癌基因 *C-erbB-1* 的表达产物, 在多种实体肿瘤中均有过表达^[1-4], 与肿瘤细胞分化、增殖、转移、侵袭等过程密切相关^[5]。*EGFR* 基因突变主要集中在 *EGFR*-TK 区第 19 外显子和第 21 外显子, 导致酪氨酸激酶组成性活化, 并引发下游信号通路的激活^[6]。分子靶向药物酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI) 可通过作用于 *EGFR*-TK 区抑制其酪氨酸激酶活性, 所以 *EGFR* 基因第 19、21 外显子突变与肿瘤细胞对 TKI 的敏感性密切相关^[7-8]。宫颈癌中 *EGFR* 基因是否存在第 19、21 外显子突变及其与 TKI 敏感性的关系目前并不十分清楚, 本研究旨在探讨 *EGFR* 基因第 19、21 号外显子在宫颈癌中的突变情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2005 年 5 月至 2008 年 12 月南昌大学医学院第二附属医院及江西省肿瘤医院 86 例宫颈癌患者的组织蜡块。常规病理切片证实肿瘤组织至少占蜡块 50% 以上, 肿瘤内无出血或坏死, 周围组织无炎症。86 例宫颈癌患者年龄 26 ~ 78 岁, 中位年龄 46 岁。病理组织学分型: 腺癌 5 例, 鳞癌 79 例和

腺鳞癌 2 例。所有病例术前均未经放疗和化疗。所有患者按照 FIGO 临床分期标准, 其中 0 期 20 例, 占 23.26%; I ~ II a 期 25 例, 占 29.07%; II b ~ IV 期 41 例, 占 47.67%。

1.2 酚-氯仿法抽提基因组 DNA

选取切片厚度为 5 μ m 的蜡块, 每份样品取 3 ~ 4 片放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中。经二甲苯脱蜡, 乙醇沉淀晾干后, 加入消化液 400 μ l, 再加入 20 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml), 56 $^{\circ}$ C 消化 4 h。然后加入等体积的苯酚置于旋转振荡器上振荡 15 h, 5 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取上清液, 加入等体积饱和酚、氯仿各 200 μ l, 置于旋转振荡器上振荡 15 h。5 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取上清液, 加入等体积氯仿-异戊醇 400 μ l, 置旋转振荡器上振荡 20 min。5 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清液加入 10% 乙酸铵和 2 倍体积的冷乙醇, 轻摇 3 ~ 5 min。5 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 倍体积的 70% 冷乙醇。5 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃 70% 的乙醇液, 重复洗涤 2 次, 倒置晾干, 加入 10 μ l Tris-EDTA 溶液(10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)溶解 DNA, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

[基金项目] 江西省教育厅科学基金项目(No. GJJ09120)。Project supported by the Science Foundation of Education Bureau of Jiangxi Province (No. GJJ09120)

[作者简介] 钟丽(1983 -), 女, 江西省萍乡市人, 在读硕士研究生, 主要从事妇产科研究。E-mail: aticlebox2009@ yahoo. cn

[通信作者] 傅芬(FU fen, corresponding author), E-mail: fu_fen@163. com

1.3 PCR 扩增 EGFR 基因第 19 外显子和第 21 外显子

根据 EGFR 核苷酸序列(Genbank NG 007726.1),应用 Prime 5.0 软件分别设计 EGFR 第 19 外显子和第 21 外显子特异性引物,并用 Oligo 6.0 软件对引物进行验证。引物由上海生物工程有限公司合成(表 1)。在 20 μl PCR 反应体系中加入 10 × PCR 反应缓冲液 2 μl、MgCl₂(25 mmol/L)1.4 μl、dNTP (Mix,10 mmol/L)0.4 μl、Taq 酶 1 U、上下游引物(25 μmol/L)各 1 μl、基因组 DNA(50 ~ 300 ng)2 μl,用 DEPC-H₂O 补充至 20 μl。PCR 反应条件为 95 °C 变性 5 min,然后 95 °C 30 s→56 °C 30 s→72 °C 1 min,35 个循环后,72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶 500V 电泳 1 h 后,银染,显色摄影。EGFR 基因第 19 外显子缺失突变(del E746 ~ E753)的非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)阳性标本由厦门大学提供。

表 1 EGFR 基因第 19 外显子和第 21 外显子引物序列

外显子	引物序列	产物 (bp)
19	上游:5'-GTG CAT CGC TGG TAA CAT CC-3'	243
	下游:5'-GGC CTG AGG TTC AGA GCC AT-3'	
21	上游:5'-TTC CCA TGA TGA TCT GTC CCT-3'	217
	下游:5'-AAG CCA CCT CCT TAC TTT GC-3'	

1.4 PCR-RLFP 检测 EGFR 基因第 21 外显子突变

野生型 EGFR 基因第 21 外显子存在 Msc I 酶切位点,而突变型 EGFR 基因第 21 外显子突变后,该酶切位点消失,可以通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RLFP)检测 EGFR 基因第 21 外显子的点突变。Msc I 消化野生型 EGFR 基因 PCR 片段,产生长度为 151 bp 和 66 bp 的 2 个小片段;而 Msc I 不能消化第 21 外显子突变的 EGFR 基因,该片段保持原长度 217 bp,因此可以区分野生型和突变型 EGFR 基因。Msc I 酶切体系包括 Msc I 酶(上海生工)0.5 μl(5 U/μl)、10 × 缓冲液 1 μl、PCR 产物 1 μl、DEPC 水 7.5 μl,至 37 °C 水浴酶切 1 h。酶切产物行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。EGFR 基因第 21 外显子点突变的 NSCLC 阳性标本由厦门大学提供。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中 EGFR 基因第 19 外显子的突变

宫颈癌 EGFR 基因第 19 外显子的 PCR 扩增产

物行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果显示,86 例宫颈癌组织 EGFR 基因 19 外显子仅在 243 bp 处有一条带(图 1);而阳性对照的 PCR 扩增产物 < 243 bp。因此结果提示,宫颈癌组织中无 EGFR 基因第 19 外显子的点突变。

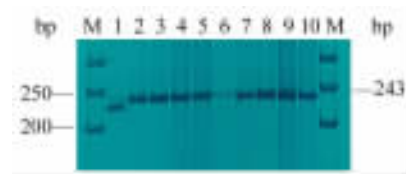


图 1 宫颈癌组织未检测到 EGFR 基因第 19 外显子的突变
M:Marker;1:NSCLC 阳性对照(< 243 bp);
2 ~ 10:宫颈癌组织(243 bp)

2.2 宫颈癌组织中 EGFR 基因第 21 外显子的突变

宫颈癌组织 EGFR 基因第 21 外显子扩增产物经 Msc I 酶切后,6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果显示,宫颈癌组织 EGFR 基因第 21 外显子扩增产物经 Msc I 酶切后均有 2 条带,长度为 151 bp 和 66 bp;而阳性对照的 PCR 扩增产物 Msc I 酶切后有 3 条带(图 2),说明所检测宫颈癌中 EGFR 基因没有第 21 外显子的点突变。

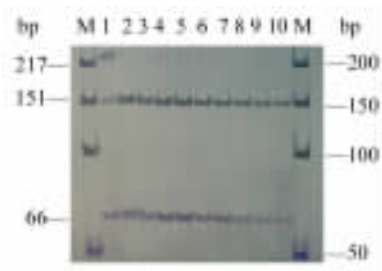


图 2 宫颈癌组织未检测到 EGFR 基因第 21 外显子突变
M:Marker;1:NSCLC 阳性对照(217 bp、151 bp、66 bp);
2 ~ 10:宫颈癌组织(151 bp、66 bp)

3 讨论

人 EGFR 基因位于 7 号染色体短臂 7p12 ~ 14 区,由 28 个外显子组成,其酪氨酸激酶功能区由第 18 ~ 24 外显子编码。近年来,流行病学及实验研究^[9-10]表明,EGFR 表达及其信号转导在肿瘤发生过程中起重要作用。Lynch 等^[7]和 Paez 等^[8]发现非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)中,EGFR 酪氨酸激酶编码区基因突变是靶向药物发挥作用的一个必要前提条件,此研究结果发表后,被其

他学者所确证^[11]。Chan 等^[12]对 *EGFR* 基因的突变进行分析后发现,尽管突变部位分散在整个酪氨酸激酶编码区,但 89% 的突变表现为第 19 外显子的缺失突变和第 21 外显子的点突变(第 858 位亮氨酸突变为精氨酸,L858R)。在宫颈癌中,是否也存在和 NSCLC 一样的 *EGFR* 基因突变,还是有新的突变位点,正是本课题拟研究的问题。

Sihto 等^[13]利用高效液相色谱对 566 例实体瘤(包括 NSCLC、神经胶质瘤、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌) *EGFR* 基因第 6、7 外显子(编码 II 亚区),第 14、15 外显子(编码 IV 亚区)及第 18、19、21 外显子(酪氨酸编码区)的突变进行检测,发现在 NSCLC 中存在 *EGFR* 基因酪氨酸编码区的第 19、21 外显子的突变,而其他肿瘤中未发现酪氨酸编码区突变。本研究结果显示,宫颈癌组织中不存在 NSCLC 中常见的 *EGFR* 基因酪氨酸激酶区的突变,这与 Arias-Pulido 等^[14]的研究结果一致。因此,将 TKI 用于宫颈癌的治疗,其疗效可能并不能像吉非替尼用于 NSCLC 的治疗疗效那么显著。

Bellone 等^[15]在研究 *EGFR* 单克隆抗体(西妥昔单抗,matuzumab)治疗宫颈癌时发现,西妥昔单抗可抑制宫颈癌细胞生长,其治疗效果除与 *EGFR* 在肿瘤细胞中的表达有关外,还与治疗前肿瘤组织内微血管的密度有关^[16]。另有研究^[17]表明,西妥昔单抗能有效控制化疗后进展期宫颈癌患者的病情。因此,*EGFR* 在宫颈癌的发生、发展和靶向治疗中具有重要作用,但是本研究未检测到宫颈癌组织中 *EGFR* 基因第 19 外显子的缺失和第 21 外显子的点突变。因此,*EGFR* 基因可能存在其他类型的突变,需通过增大样本量后采用基因测序等方法进行进一步的研究,探索宫颈癌 *EGFR* 基因新的突变位点将为宫颈癌的靶向治疗奠定重要的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ratushny V, Astsaturov I, Burtneess BA, Golemis EA, Silverman JS. Targeting *EGFR* resistance networks in head and neck cancer [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(8): 1255-1268.
- [2] Kim SJ, Rabbani ZN, Dong F, Vollmer RT, Schreiber EG, Dewhirst MW, et al. Phosphorylated epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression in localized non-small-cell lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(1): 91-97.
- [3] Matkovic B, Juretic A, Separovic V, Novosel I, Separovic R, Gamulin M, et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, HER-2, CK 5/6, p63 and *EGFR* antigen expression in medullary breast cancer [J]. *Tumor*, 2008, 94(6): 838-844.
- [4] Molaei M, Pejhan S, Nayer BN, Moradi A, Ghiasi S, Zali MR. Human epidermal growth factor receptor-2 family in colorectal adenocarcinoma: Correlation with survival and clinicopathological findings [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(3): 289-293.
- [5] Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(14): 2787-2799.
- [6] 武晓楠. 表皮生长因子受体基因在多种肿瘤中的突变情况及临床意义 [J]. *中国全科医学*, 2008, 11(A): 1197-1201.
- [7] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21): 2129-2139.
- [8] Paez JG, Janne PA, Lee JC, Lee JC, Tracy S, Greulich H, et al. *EGFR* mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [9] Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer [J]. *Semin Oncol*, 2006, 33(4): 369-385.
- [10] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. *EGFR* and cancer prognosis [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(4): 9-15.
- [11] Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, Oh DY, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(11): 2493-2501.
- [12] Chan SK, Gullick WJ, Hill ME. Mutation of the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer: Search and destroy [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(1): 17-23.
- [13] Sihto H, Joensuu H, Tanner M. Epidermal growth factor receptor domain II, IV, and kinase domain mutations in human solid tumors [J]. *J Mol Med*, 2005, 83(12): 976-983.
- [14] Arias-Pulido H, Joste N, Chavez A Muller CY, Dai D, Smith HO, et al. Absence of epidermal growth factor receptor mutations in cervical cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(4): 749-754.
- [15] Bellone S, Frera G, Landolfi G, Romani C, Bandiera E, Tognon GN, et al. Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (*EGFR*) in cervical cancer: Implications for cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106(3): 513-520.
- [16] Sobbach C, Roller M, Nicoletti M, Budischewski K, Knecht R, Kaufmann M. Cancer of the uterine cervix is susceptible to anti-*EGFR*-R antibody EMD 55900 therapy [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4261-4267.
- [17] Blohmer J, Gore M, Kuemmel S, Verheijen RH, Kimmig R, Masuger LFAG, et al. Phase II study to determine response rate, pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), safety, and tolerability of treatment with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (*EGFR*) monoclonal antibody EMD 72000 (matuzumab) in patients with recurrent cervical cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(16): 1745.

[收稿日期] 2010 - 08 - 15

[修回日期] 2010 - 09 - 25

[本文编辑] 王 莹